第7卷第1期 动物学研究 Vol. 7, No.1
1986年2月 ZOOLOGICAL RESEARCH Feb., 1986

浙江产蝮蛇 *Agkistrodon halys* (Pallas) 蛇毒磷酸二酯酶的酶学性质及其对大分子核酸的作用

段志忠 涂光俦

(中国科学院昆明动物研究所)

摘要

1.以双对硝基苯磷酸钠为底物，测得蝮蛇毒磷酸二酯酶的最适 pH 在10左右，最适温度在 60℃左右；酶在37℃和60℃的 Km 分别为$5.65\times10^{-4}M$和$7.97\times10^{-4}M$。

2.酶在 pH 5—10.5范围和50℃以下稳定。

3.钙离子和镁离子对酶活力有激活作用，但钡离子，镁离子、锌离子、二价铅离子、钴离子、二价和三价铁离子、锰离子、镍离子等都有不同程度地抑制作用。

4.除乙酸根离子外，碳酸根，硫酸根，乙二胺四乙酸根、磷酸根，钼酸根，酒石酸根，柠檬酸根，亚硝酸根，巴比妥酸根和硫代硫酸根等阴离子都有不同程度地抑制作用。

5.蝮蛇毒磷酸二酯酶能充分水解 RNA 和 DNA 但后者的水解速度比前者快许多。

关键词 蝮蛇 蛇毒磷酸二酯酶 酶学性质 DNA 和 RNA 的水解

蛇毒磷酸二酯酶由于能从3'—端顺序地降解寡核苷酸或多核苷酸，生成5'—单核苷酸，因而在核酸的鉴定和序列测定方面获得了广泛的应用。关于它的酶学性质，国外一些实验室做了不少工作（Razzell & Khoraha, 1959; Suzuki 等, 1960; Philips, 1975）。1979年，我们从浙江产蝮蛇毒中分离纯化了圆盘电泳纯的蛇毒磷酸二酯酶。作为一种商品制剂，它的几项主要质量标准达到或超过了国外同类产品的水平（涂光俦等, 1979）。用于核糖和脱氧核糖寡核苷酸的序列分析，获得了满意的结果（中国科学院上海生化所核酸合成组，1978；人工合成核酸协作组，1978）。

本文报道了蝮蛇毒磷酸二酯酶的一些酶学性质，并观察了它对 RNA 和 DNA 的水解作用。

本文1984年9月4日收到，1985年3月11日收到修改稿。

材 料 和 方 法

蝮蛇毒磷酸二酯酶 按照前文（涂光俦等，1979）方法制备。

试剂 酵母 RNA，中国科学院上海生化所东风试剂厂产品；DNA 和双对硝基苯磷酸钠盐，BDH 产品，其它均为国产分析纯试剂。

文中〈六〉所用试剂为乙酸钠，碳酸钠，硫酸钠，乙二胺四乙酸二钠。〈七〉所用试剂为氯化钙，氯化镁、氯化钡，氯化铜。

以上几种离子在反应体系中的最终浓度均为$10^{-2}M$。

酶活力测定方法同前文（涂光俦等，1979）。

文中一、二、三、四、五所用方法参见朱俭等文（1981）。

六、七所用方法见涂光俦等文（1981）。

八、九所用方法参见 McDonald（1955）。

结 果

一、酶促反应的最适 pH 由图一可以看出 pH 对酶反应的影响为一钟罩形曲线，酶促反应的最适 pH 在10左右。

二、pH 对酶稳定性的影响 虽然酶促反应的最适pH范围很窄，在10左右，但酶在 pH 5至10.5范围内却是稳定的。只有当 pH＜5 和 pH＞10.5时，酶的稳定性才急骤降低（图 2）。

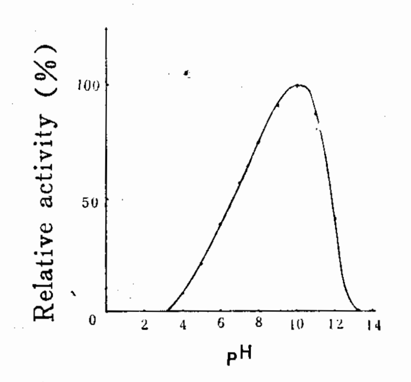


Fig. 1 Effect of pH on activity of phosphodiesterase

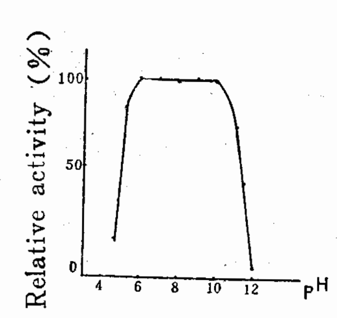


Fig. 2 Effect of pH on stability of phosphodiesterase

三、酶促反应的最适温度 由图 3 可以看出，温度对酶反应的影响亦为一钟罩形曲线，酶促反应的最适温度在60°C左右。

四、温度对酶稳定性的影响 由图 4 可以看出，温度低于50°C，酶是较稳定的，

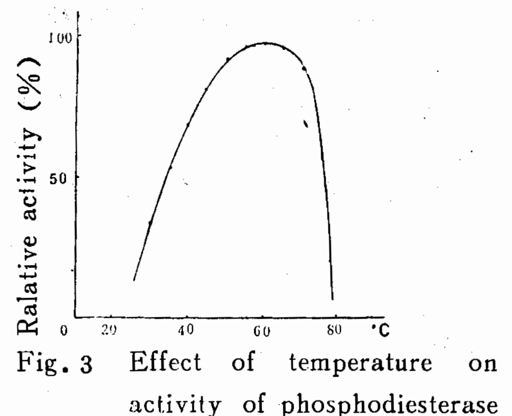


Fig. 3　Effect of temperature on activity of phosphodiesterase

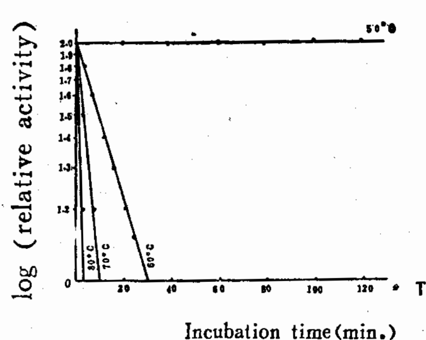


Fig. 4　Effect of temperature on stability of phosphodiesterase

温度超过60°C，酶活力随保温时间延长而急骤下降，在80°C，酶保温仅5分钟活力就完全丧失。

五、Km　用双对硝基苯磷酸作底物时，用1/[s]对1/v作图，求得蝮蛇毒磷酸二酯酶在37°C和60°C的Km值分别为$5.65\times10^{-4}M$和$7.97\times10^{-4}M$（图5）。

六、不同离子对酶活力的影响　实验观察了几种阴离子和阳离子对酶活力的影响。图6表明，乙酸根对酶活力无影响，而碳酸根，硫酸根和乙二胺四乙酸根对酶活力都有明显的抑制作用。

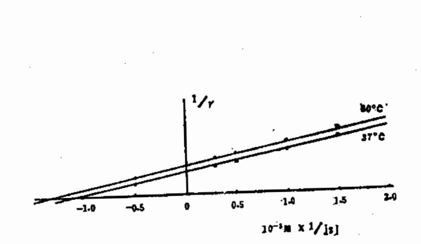


Fig. 5　Lineweave-Burk plot of rate of hydrolysis of Di-p-nitrophenyl phosphate-Na_2 against substrate concentration. Velocity in μmoles per min per O. D_{280} of protein; substrate concentration in moles per liter

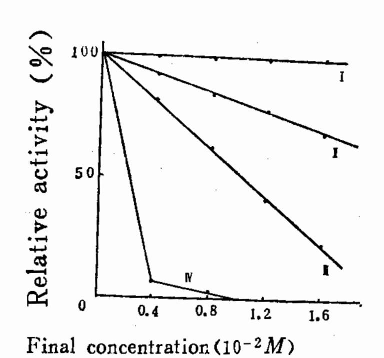


Fig. 6　Effects of some anions on activity of phosphodiesterase

Ⅰ $CH_3CO_2^{-1}$　Ⅱ CO_3^{-2}

Ⅲ SO_4^{-2}　Ⅳ EDTA

除了上述阴离子外，还实验了：磷酸根，钼酸根，酒石酸根，柠檬酸根，亚硝酸根，巴比妥酸根和硫代硫酸根离子，它们对酶活力都有不同程度的抑制作用。

图7表明，阳离子中钙离子和镁离子对酶有激活作用，而钡离子和铜离子对酶有抑制作用。

除上述两价阳离子外，还实验了锌离子，二价铅离子，钴离子，亚铁离子，两价和三价铁离子，锰离子，镍离子，它们对酶活力都有不同程度的抑制作用。

七、酶对 DNA 的水解 在我们的实验条件下，蝮蛇毒磷酸二酯酶能在5小时内顺利地将DNA完全水解（图8）。

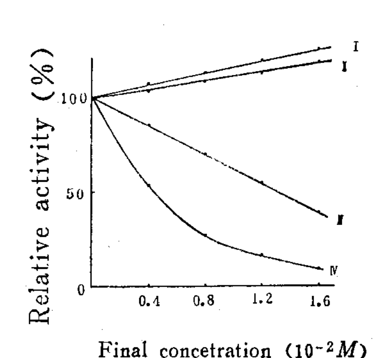


Fig.7 Effects of some cations on activity of phosphodiesterase
I Ca^{++} II. Mg^{++}
III Ba^{++} IV Cu^{++}

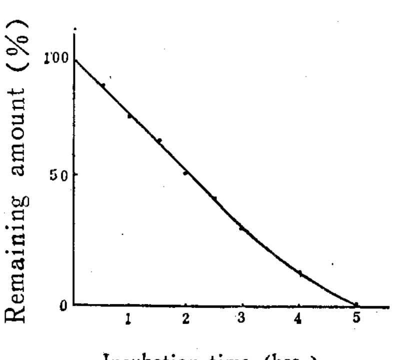
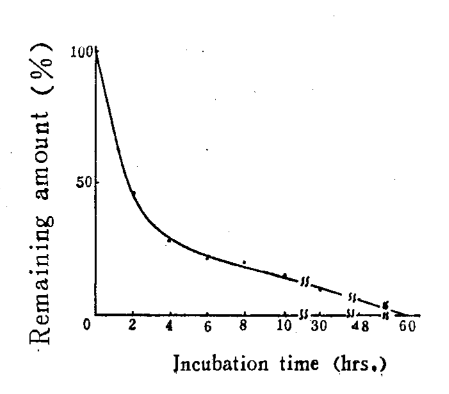


Fig.8 Hydrolysis of DNA by phosphodiesterase
The hydrolysis of DNA was determined according to McDonald's (1955) method.

八、酶对酵母 RNA 的水解 与DAN相比，蝮蛇毒磷酸二酯酶对酵母RNA的水解就要缓慢多了，水解48小时，大分子RNA仍残留10%左右，但再次加酶仍能把大分子RNA水解完全（图9）。

Fig.9 Hydrolysis of yeast RNA by phosphodiesterase The hydrolysis of yeast RNA was determined according to McDonald's (1955) method.



讨　　论

尽管英国 BDH 公司，美国 Sigma 和 Worthington 公司都已有蛇毒磷酸二酯酶的商品制剂出售，但是，分离纯化不同蛇毒磷酸二酯酶并研究其性质的工作一直没有间断。前年 Ferlan 和 Russell（1982）还报道从黑尾响尾蛇(*Crotaus molossus molossus*)蛇毒中分离纯化了一种磷酸二酯酶并研究了它的性质。

我国没有响尾蛇属的毒蛇，但蝮蛇资源很丰富。从蝮蛇毒纯化磷酸二酯酶并批量生产，对于满足国内核酸研究的需要具有一定的意义。使用情况表明，该酶用于核糖和脱氧核糖寡核苷酸的分析获得了满意的结果。本文的研究又表明，蝮蛇毒磷酸二酯酶同国外其它来源的酶相比，它们的酶学性质（最适 pH，最适温度，Km 值……等）大同小异。与国外结果（Razzell 和Khorana，1959；Suzuki，1960）不同的是，除钙、镁离子激活外，抑制酶活力的金属离子不止是铜离子，其它试验过的金属离子都不同程度地抑制酶活力。

对于阴离子对酶活力的抑制作用，国外研究较少，我们的结果表明，除乙酸根离子之外其它试验过的阴离子都对酶活力有抑制作用。

一般来说，蛇毒磷酸二酯酶水解脱氧核糖核苷酸的二酯键要比水解核糖核苷酸的二酯键快得多，蝮蛇毒磷酸二酯酶也是如此。DNA 和 RNA 都能被此酶完全水解，只是快慢不同。这个结果提示蝮蛇毒磷酸二酯酶不仅可以用于寡核苷酸的分析，而且也有可能用于多核苷酸的分析。

参　考　文　献

涂光俦等　1979　蛇毒的研究与利用 IV．浙江产蝮蛇毒的柱层析分离及磷酸二酯酶的大规模纯化。生物化学与生物物理学报11（2）：169—174

涂光俦等　1981　浙江产蝮蛇蛇毒血纤蛋白溶酶酶学性质的研究。动物学研究 2（4）增刊：117—120

中国科学院上海生物化学研究所二室核酸合成组　1978　多核苷酸的研究 I．生物化学与生物物理学报 2：127

人工合成核酸协作组　1978　多核苷酸的研究。中国科学 6：679

朱俭等　1981　生物化学实验：204—233。上海科学技术出版社

Ferlan, I. *et al.*　1983　Purification and characterization of phosphodiesterase from *Crotalus molossus molossus* venom. Toxicon, Supplement 3, 7th World congress on animal plant and microbial toxins. Brisbane. Australia, 11—16 July, 1983　pp.137—140

McDonald, M. R,　1955　Ribonucleases and Deoxyribonucleases. in "Methods in Enzymology II" (eds. by Colowick and Kaplan) pp. 427—447

Philipps, G. R.　1975 Hopper-Seyler'S Z. physiol. *Chem.* 356：1085

Razzell, W. E., Khorana, H. G.　1959　Studies on polypeptides Ⅱ. Enzymatic degradation. Substrate specificity and properties of snake venom phosphodiesterase. *J. Biol. Chem.* 234:2105—2113

Suzuki. T. *et al.*　1960　Studies on snake venom Ⅶ. On the properties of three phosphodiesterases obtained from Mamushi venom (*Agkistrodon halys blomhoffii*, Boie). *J. Pharm. Soc. Jpn.* 80: 861—867

PROPERTIES OF PHOSPHODIESTERASE OF *AGKISTRODON HALYS* (PALLAS) VENOM (FROM ZHEJIANG PROVINCE) AND ITS ACTIONS ON BOTH RNA AND DNA

Duan Zhizhong Tu Guangchou

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

1. When di-p-nitrophenyl phosphate (Na salt) is used as the substrate, the optimal pH and the optimal temperature of phosphodiesterase of *Agkistrodon halys* (Pallas) venom are found at about 10 and 60°C respectively. At 37°C and 60°C the enzyme has Km of 5.65×10^{-4} M and $7.97\times10^{-4}M$.

2. The enzyme is stable at temperature below 50°C and within pH 5 - 10.5 range.

3. Ca and Mg ions activate, whereas the other metal ions inhibite the activity of the enzyme.

4. All anions tested besides acetate show the inhibition on the enzyme.

5. The enzyme can fully hydrolyse RNA and DNA, although the latter is hydrolysed faster than the former.

Key words *Agkistrodon halys* (pallas)
Phosphodiesterase of venom
Properties of enzyme
Hydrolysis of RNA and DNA